SNI

Standar Nasional Indonesia

SNI 7547:2009

Deteksi *Koi Herpesvirus* (KHV) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (*single step*)

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

ICS 65.150

Badan Standardisasi Nasional

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Daftar isi

Daftar isi i
Prakata ii
1 Ruang lingkup 1
2 Istilah dan definisi 1
3 Penyiapan dan penyimpanan contoh 2
4 Prinsip 2
5 Peralatan 2
6 Bahan 2
7 Prosedur 3
8 Pembacaan hasil 5
9 Keamanan dan keselamatan kerja 5
Lampiran A (normatif) Pembuatan media 6

Gambar 1 - Contoh positif akan menghasilkan pita DNA 290 bp, sedangkan contoh negatif tidak menghasilkan pita apapun 5

Tabel 1 - Komposisi pereaksi untuk setiap sampel 3
Tabel 2 - Pengaturan suhu dan siklus *thermocycler* 3

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang deteksi *Koi Herpesvirus* (KHV) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (*single step*).

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas dalam rapat-rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 25 Agustus 2008 di Bogor dengan memperhatikan:

1 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 2 April 2009 sampai dengan 2 Juni 2009 dengan hasil akhir RASNI.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Deteksi *Koi Herpesvirus* (KHV) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (*single step*)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Koi Herpesvirus* (KHV) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (*single step*).

2 Istilah dan definisi

2.1
amplifikasi
reaksi pelipatgandaan jumlah DNA target secara *in vitro* dengan elektroforesis

2.2
annealing
penempelan *oligonucleutida* primer pada DNA untai tunggal

2.3
***Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA)**
asam nukleat yang merupakan bahan genetik dari kebanyakan sel organisme

2.4
denaturasi
pemisahan DNA target dari untai ganda menjadi untai tunggal

2.5
DNA polymerase
enzim yang berfungsi membantu dalam proses replikasi DNA

2.6
extention
pemanjangan primer dengan bantuan enzim *polymerase*, sehingga akan terbentuk 2 buah DNA untai tunggal baru

2.7
final elongation
proses akhir dari pemanjangan untuk memastikan rantai DNA teramplifikasi dengan sempurna

2.8
***Koi Herpesvirus* (KHV)**
virus dari famili *Herpesviridae* yang menyerang ikan mas dan koi (*Cyprinus carpio*)

2.9
PCR
reaksi berantai *polymerase*, merupakan perbanyakan untai DNA panjang tertentu secara *in vitro* menggunakan enzim *polymerase*

2.10
pre-denaturasi
proses persiapan untuk denaturasi

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

2.11
primer
suatu *oligonukleotida* (*nukleotida* dengan panjang rantai asam nukleat antara 20 - 30) digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

3 Penyiapan dan penyimpanan contoh

3.1 Penyiapan contoh

Sample yang akan digunakan, disiapkan dengan persyaratan sebagai berikut:
- organ target utama adalah insang atau ginjal atau limfa;
- sampel larva < 1 cm digunakan seluruh bagian tubuh.

3.2 Penyimpanan contoh

Sampel disimpan dengan direndam dalam alkohol 90 %.

4 Prinsip

Contoh organ berupa insang atau ginjal atau limfa (untuk ikan ukuran besar) atau seluruh bagian tubuh (untuk larva) dipreparasi, kemudian secara berturut-turut dilakukan ekstraksi materi genetik (DNA), reaksi PCR, elektroforesis, dokumentasi dan pembacaan hasil.

5 Peralatan

a) *glassware*;
b) *hotplate magnetic stirer/microwave*;
c) kamera/alat dokumentasi;
d) mesin *portable/table top micro-centrifuge*;
e) mikro pipet 1000 µl, 200 µl, 100 µl,10 µl;
f) *pellet pestle*;
g) perangkat *elektroforesis*;
h) *power supplay* untuk elektroforesis;
i) *stirer bar*;
j) *thermal cycler* (mesin PCR);
k) timbangan analitik;
l) *uv trans-illuminator*;
m) *vortex mixer*.

6 Bahan

a) *agarose*;
b) alkohol proanalisis (P.A);
c) *buffer* 1 x TAE atau TBE;
d) ddH_2O (*milique water*);
e) DEPC (*nuclease free water*);
f) *ethidium bromide* 10 mg/mL;
g) HEPES;
h) kit isolasi DNA;
i) *marker* 100 bp DNA *ladder primer* yang digunakan dari Grey et.al 2002 yang sudah diperbaiki oleh Yuasa et.al 2005 dengan susunan sekuen:

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Corrected Sh I-5 primer set (290 bp) F; 5'-GAC ACC ACA TCT GCA AGG AG-3
R: 5'-GAC ACA TGT TAC AAT GGT CGC-3

j) mikrotube 0,2 ml dan 1,5 ml;
k) mikrotip 1000 µl, 200 µl,10 µl;
l) NaOH;
m) pereaksi PCR *mix bead* (*pure taq Ready-To-Go* (RTG) PCR *beads*, 100 rxns - 0,2 mL);
n) 6 x *loading dye* (250 µl).

7 Prosedur

7.1 Ekstrasi DNA

a) Ambil organ sebanyak 25 mg - 50 mg ditambahkan 1000 µl larutan DNAzol kemudian hancurkan menggunakan *pellet pestle*.
b) Kemudian sentrifugasikan 11.000 rpm (r = 7 cm) selama 10 menit.
c) Pindahkan supernatan 500 µl - 700 µl ke dalam mikrotube baru dan tambahkan 100 % alkohol 500 µl dan campurkan dengan cara dibolak-balik.
d) Simpan pada suhu 25 °C - 30 °C selama 1 menit - 3 menit kemudian disentrifugasi 7.000 rpm (r = 7 cm) selama 1 menit - 2 menit.
e) Buang supernatan, kemudian cuci *pellet* sebanyak 2 kali dengan menambahkan 800 µl -1000 µl alkohol 75 %, Campur dengan cara membolak-balikan sebanyak 6 kali dan diamkan beberapa saat hingga DNA terkumpul di dasar mikrotube, Buang alkohol dengan menggunakan pipet (atau dengan mensentrifugasi pada 7.000 rpm (r = 7 cm) selama 1 menit - 2 menit kemudian buang alkohol) kemudian keringkan selama 5 detik - 15 detik.
f) Larutkan DNA segera setelah supernatan dibuang dengan menambahkan 200 µl - 300 µl campuran 8 mM NaOH (untuk 50 µl 8 mM NaOH ditambahkan 1,6 µl 0,1 mM - 1 mM HEPES) atau ddH_2O.
g) DNA terlarut dapat disimpan pada suhu 4 °C atau langsung digunakan untuk amplifikasi DNA atau disimpan pada suhu - 20 °C.

7.2 Amplifikasi

7.2.1 Komposisi pereaksi untuk setiap sampel:

Tabel 1 - Komposisi pereaksi untuk setiap sampel

No	Pereaksi	Jumlah atau volume pereaksi
1	RTG PCR *bead*	1 butir
2	Primer F290 (20 ρMol) Primer R290 (20 ρMol)	2 µl 2 µl
3	Te*mplate* DNA	2 µl
4	Akuades steril	19 µl
Total		25 µl

7.2.2 Pengaturan suhu dan siklus *thermocycler*

Tabel 2 - Pengaturan suhu dan siklus *thermocycler*

No	Pereaksi	Suhu (°C)	Lama	Jumlah siklus
1	*Pre-denaturation*	94	30 detik	1
2	*Denaturation*	94	30 detik	40
3	*Annealing*	63	30 detik	

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Tabel 2 (lanjutan)

No	Pereaksi	Suhu (°C)	Lama	Jumlah siklus
4	*Extension*	72	30 detik	40
5	*Final elongation*	72	7 menit	1
6	*Store*	4	tidak dibatasi atau tidak terhingga	

7.3 Metode elektroforesis

7.3.1 Elektroforesis

a) Siapkan parafilm di depan unit elektroforesis.
b) Siapkan 2 µl *loading dye* sesuai jumlah sampel.
c) Lakukan preparasi DNA marker dengan prosedur sesuai dengan aturan dari produk yang akan dipakai. Masukkan 4 µl *marker* ke dalam sumur gel *agarose*.
d) Ambil 10 µl hasil PCR (*amplicon*) dan campurkan dengan masing-masing *loading dye*;
e) Masukkan 10 µl campuran tersebut ke dalam sumur-sumur berikutnya.
f) Alirkan listrik 100 V hingga indikator warna *bromphenol blue* bergerak 3/4 bagian dari panjang gel, hindari jangan sampai *loading dye* keluar dari gel.

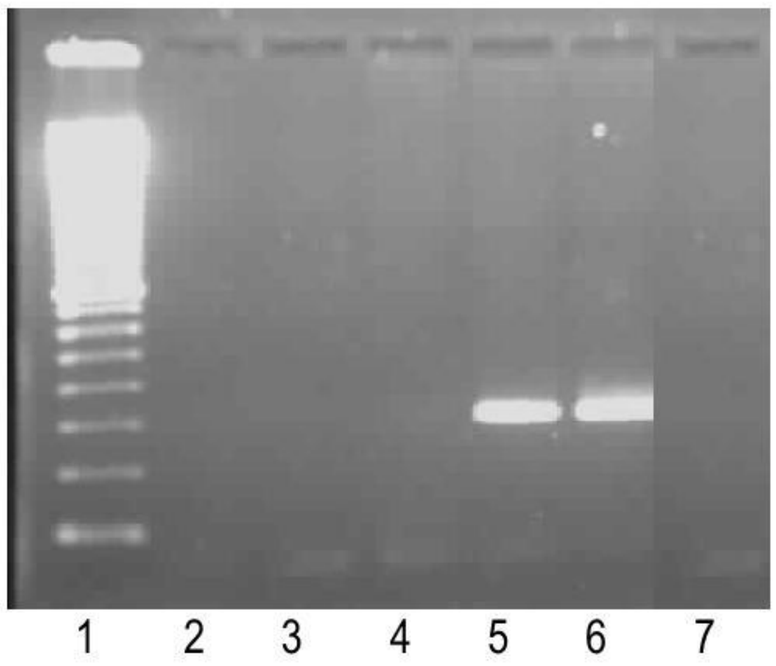
CATATAN: Apabila menggunakan marker komersil menggunakan petunjuk di kit komersil.

7.4 Pewarnaan gel

a) Masukkan gel *agarose* ke larutan pewarnaan (0,05 % *ethitidium bromide*) dalam wadah plastik, sampai terendam seluruhnya.
b) Biarkan pada suhu ruang selama 10 menit kemudian angkat.
c) Bilas gel *agarose* dalam akuades selama 10 menit.
d) Letakkan *agarose* gel pada UV *transiluminator* kemudian baca hasil akhirnya.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

8 Pembacaan hasil



Keterangan gambar:

1 : *marker*
2 : contoh negatif KHV
3 : contoh negatif KHV
4 : contoh negatif KHV
5 : contoh positif KHV
6 : kontrol positif KHV
7 : kontrol negatif KHV

Gambar 1 - Contoh positif akan menghasilkan pita DNA 290 bp, sedangkan contoh negatif tidak menghasilkan pita apapun

9 Keamanan dan keselamatan kerja

a) Gunakan jas laboratorium, sarung tangan dan penutup mulut. Dan jika berambut panjang harus diikat dengan rapi selama bekerja di laboratorium.
b) Dilarang merokok, makan (termasuk permen karet) atau minum di ruangan laboratorium.
c) Jangan memasukkan pensil, pulpen, kertas label dan barang lainnya ke dalam mulut saat bekerja di laboratorium. Benda-benda tersebut juga tidak boleh dibawa keluar ruangan laboratorium untuk menghindari kontaminasi.
d) Dilarang memipet menggunakan mulut, dan hindarkan aerosol saat memindahkan cairan.
e) Bersihkan meja kerja dengan desinfektan sebelum dan sesudah bekerja.
f) Tempatkan dalam wadah khusus gel dan semua peralatan sekali pakai seperti tissue, sarung tangan dan dan material padat lainnya yang mengandung *ethidium bromide*, untuk kemudian diserahkan kepada pihak ketiga secara periodik untuk dimusnahkan.
g) Tempatkan *ethidium bromide* yang kandungannya lebih besar dalam wadah. Serahkan wadah tersebut kepada pihak ketiga secara periodik untuk dimusnahkan.
h) Jika terjadi tumpahan ethidium bromide, jika sedikit serap dengan tissue, jika banyak serap dengan *attapulgit absorbsion* kemudian gosok dengan tissue handuk yang dibasahi dengan campuran 4,2 gram *sodium nitrite* dalam 300 ml air dan tambahkan 20 ml *hyphosphorous acid* (50 %). Aduk rata agar tercampur (pH 1,8). Kemudian keringkan.
i) Buanglah material tajam (jarum, *scalpel*, slide pecah, tip, dll) kedalam wadah pembuangan khusus material tajam. Serahkan wadah tersebut kepada pihak ketiga secara periodik untuk dimusnahkan.
j) Cuci tangan dengan air dan sabun sebelum dan setelah selesai bekerja.
k) Bekerjalah dengan berhati-hati dan tidak terburu-buru.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran A
(normatif)
Pembuatan media

A.1 Penyiapan *ethidium bromide*

Ethidium bromide (EtBr) disiapkan dalam larutan *stock* 10 mg/ml dalam botol gelap

CATATAN: *Ethidium bromide* merupakan bahan mutagen yang sangat kuat dan dapat menyebabkan kanker, maka jika sedang bekerja dengan menggunakan *ethidium bromide* pakailah selalu sarung tangan.

A.2 Pembuatan akohol 75 %

a) Tuangkan alkohol absolut sebanyak 75 ml ke dalam gelas ukur.
b) Tambahkan akuades sampai dengan volume 100 ml.

A.3 Persiapan *agarose*

a) Buat agarose 1,5 % - 2 % (w/v) dalam larutan 1 x TAE atau 1 x TBE ke dalam botol gelas.
b) Panaskan pada suhu 100 °C - 150 °C selama 10 menit dalam *hotplate magnetic stirrer/microwave* (sampai larutan bening).
c) Angkat dari pemanas, buka tutup botol, kemudian diamkan hingga suhu 60 °C. Apabila menggunakan *hotplate stirrer* ambil *stirrer bar* terlebih dahulu.
d) Kemudian tuangkan larutan *agarose* ke dalam cetakan agarose yang telah dipasangi sisir (*comb*).
e) Hindari terjadinya gelembung udara.
f) Buang gelembung udara yang terbentuk dengan mikrotip.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Bibliografi

Yuasa Kei et all. 2005. *Improvement of a PCR method with the Sph I-5 Primer set for the detection of Koi Herpesvirus (KHV)* dalam Fish Pathology. 2005.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id